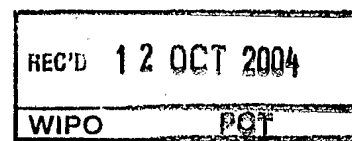


PCT/EP200 4/ 05 17 11



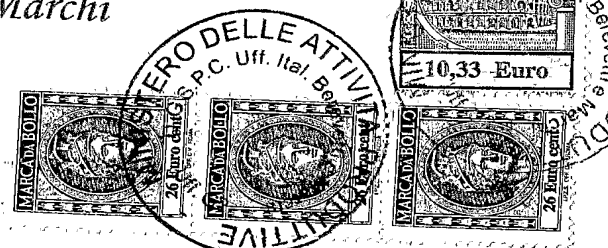
27 SEP 2004

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2003 A 001607 del 05.08.2003

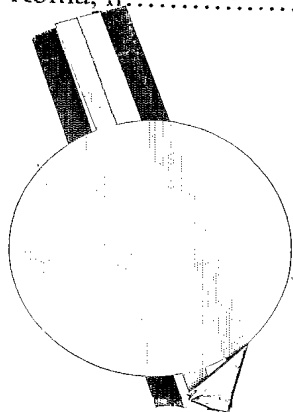
Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Roma, li. 13 AGO. 2004

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

IL FUNZIONARIO
Ing. DI CARLO

[Signature]



4318PTIT

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO.

MODULO A

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione CIPOLLONE FRANCESCO
 Residenza MONTESILVANO (PE) codice CPLFNC65R28A515X
 2) Denominazione MEZZETTI ANDREA
 Residenza FRANCAVILLA AL MARE (CH) codice MZZZNR49C13H945X

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dr. Diego Pallini ed altri cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza Notarbartolo & Gervasi S.p.A.
 via C.so di Porta Vittoria n. 9 città Milano cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci) C12Q gruppo/sottogruppo _____

Metodo e kit per la valutazione del rischio di patologie cardiovascolari ad eziologia ateromatosa

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) CIPOLLONE Francesco 3) MARTINOTTI Stefano
 2) MEZZETTI Andrea 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
1) <u>nessuna</u>				
2) _____				

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.	PROV	n. pag.	PROV	n. tav.	contenuto
Doc. 1) <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>132</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>103</u>	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2) <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3) <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
Doc. 4) <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		designazione inventore
Doc. 5) <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro Duecentonovantuno/80.=COMPILATO IL 05/08/2003FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) Diego Pallini

obbligatorio

CONTINUA SI/NO SIDEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANO MILANOVERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA MI2003A 001607

Reg. A.

codice 151L'anno DUEMILATREil giorno CINQUEdel mese di AGOSTOil(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 01

fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

G. SURACI

REG. A

DATA DI DEPOSITO

05 08 2003

NUMERO BREVETTO _____

DATA DI RILASCIO

L1/L2/L3/L4/L5/L6/L7/L8/L9/L10/L11/L12/L13/L14/L15/L16/L17/L18/L19/L20/L21/L22/L23/L24/L25/L26/L27/L28/L29/L30/L31/L32/L33/L34/L35/L36/L37/L38/L39/L40/L41/L42/L43/L44/L45/L46/L47/L48/L49/L50/L51/L52/L53/L54/L55/L56/L57/L58/L59/L60/L61/L62/L63/L64/L65/L66/L67/L68/L69/L70/L71/L72/L73/L74/L75/L76/L77/L78/L79/L80/L81/L82/L83/L84/L85/L86/L87/L88/L89/L90/L91/L92/L93/L94/L95/L96/L97/L98/L99/L100/L101/L102/L103/L104/L105/L106/L107/L108/L109/L110/L111/L112/L113/L114/L115/L116/L117/L118/L119/L120/L121/L122/L123/L124/L125/L126/L127/L128/L129/L130/L131/L132/L133/L134/L135/L136/L137/L138/L139/L140/L141/L142/L143/L144/L145/L146/L147/L148/L149/L150/L151/L152/L153/L154/L155/L156/L157/L158/L159/L160/L161/L162/L163/L164/L165/L166/L167/L168/L169/L170/L171/L172/L173/L174/L175/L176/L177/L178/L179/L180/L181/L182/L183/L184/L185/L186/L187/L188/L189/L190/L191/L192/L193/L194/L195/L196/L197/L198/L199/L200/L201/L202/L203/L204/L205/L206/L207/L208/L209/L210/L211/L212/L213/L214/L215/L216/L217/L218/L219/L220/L221/L222/L223/L224/L225/L226/L227/L228/L229/L230/L231/L232/L233/L234/L235/L236/L237/L238/L239/L240/L241/L242/L243/L244/L245/L246/L247/L248/L249/L250/L251/L252/L253/L254/L255/L256/L257/L258/L259/L260/L261/L262/L263/L264/L265/L266/L267/L268/L269/L270/L271/L272/L273/L274/L275/L276/L277/L278/L279/L280/L281/L282/L283/L284/L285/L286/L287/L288/L289/L290/L291/L292/L293/L294/L295/L296/L297/L298/L299/L300/L301/L302/L303/L304/L305/L306/L307/L308/L309/L310/L311/L312/L313/L314/L315/L316/L317/L318/L319/L320/L321/L322/L323/L324/L325/L326/L327/L328/L329/L330/L331/L332/L333/L334/L335/L336/L337/L338/L339/L340/L341/L342/L343/L344/L345/L346/L347/L348/L349/L350/L351/L352/L353/L354/L355/L356/L357/L358/L359/L360/L361/L362/L363/L364/L365/L366/L367/L368/L369/L370/L371/L372/L373/L374/L375/L376/L377/L378/L379/L380/L381/L382/L383/L384/L385/L386/L387/L388/L389/L390/L391/L392/L393/L394/L395/L396/L397/L398/L399/L400/L401/L402/L403/L404/L405/L406/L407/L408/L409/L410/L411/L412/L413/L414/L415/L416/L417/L418/L419/L420/L421/L422/L423/L424/L425/L426/L427/L428/L429/L430/L431/L432/L433/L434/L435/L436/L437/L438/L439/L440/L441/L442/L443/L444/L445/L446/L447/L448/L449/L450/L451/L452/L453/L454/L455/L456/L457/L458/L459/L460/L461/L462/L463/L464/L465/L466/L467/L468/L469/L470/L471/L472/L473/L474/L475/L476/L477/L478/L479/L480/L481/L482/L483/L484/L485/L486/L487/L488/L489/L490/L491/L492/L493/L494/L495/L496/L497/L498/L499/L500/L501/L502/L503/L504/L505/L506/L507/L508/L509/L510/L511/L512/L513/L514/L515/L516/L517/L518/L519/L520/L521/L522/L523/L524/L525/L526/L527/L528/L529/L530/L531/L532/L533/L534/L535/L536/L537/L538/L539/L540/L541/L542/L543/L544/L545/L546/L547/L548/L549/L550/L551/L552/L553/L554/L555/L556/L557/L558/L559/L560/L561/L562/L563/L564/L565/L566/L567/L568/L569/L570/L571/L572/L573/L574/L575/L576/L577/L578/L579/L580/L581/L582/L583/L584/L585/L586/L587/L588/L589/L590/L591/L592/L593/L594/L595/L596/L597/L598/L599/L600/L601/L602/L603/L604/L605/L606/L607/L608/L609/L610/L611/L612/L613/L614/L615/L616/L617/L618/L619/L620/L621/L622/L623/L624/L625/L626/L627/L628/L629/L630/L631/L632/L633/L634/L635/L636/L637/L638/L639/L640/L641/L642/L643/L644/L645/L646/L647/L648/L649/L650/L651/L652/L653/L654/L655/L656/L657/L658/L659/L660/L661/L662/L663/L664/L665/L666/L667/L668/L669/L670/L671/L672/L673/L674/L675/L676/L677/L678/L679/L680/L681/L682/L683/L684/L685/L686/L687/L688/L689/L690/L691/L692/L693/L694/L695/L696/L697/L698/L699/L700/L701/L702/L703/L704/L705/L706/L707/L708/L709/L710/L711/L712/L713/L714/L715/L716/L717/L718/L719/L720/L721/L722/L723/L724/L725/L726/L727/L728/L729/L730/L731/L732/L733/L734/L735/L736/L737/L738/L739/L740/L741/L742/L743/L744/L745/L746/L747/L748/L749/L750/L751/L752/L753/L754/L755/L756/L757/L758/L759/L760/L761/L762/L763/L764/L765/L766/L767/L768/L769/L770/L771/L772/L773/L774/L775/L776/L777/L778/L779/L780/L781/L782/L783/L784/L785/L786/L787/L788/L789/L790/L791/L792/L793/L794/L795/L796/L797/L798/L799/L800/L801/L802/L803/L804/L805/L806/L807/L808/L809/L810/L811/L812/L813/L814/L815/L816/L817/L818/L819/L820/L821/L822/L823/L824/L825/L826/L827/L828/L829/L830/L831/L832/L833/L834/L835/L836/L837/L838/L839/L840/L841/L842/L843/L844/L845/L846/L847/L848/L849/L850/L851/L852/L853/L854/L855/L856/L857/L858/L859/L860/L861/L862/L863/L864/L865/L866/L867/L868/L869/L870/L871/L872/L873/L874/L875/L876/L877/L878/L879/L880/L881/L882/L883/L884/L885/L886/L887/L888/L889/L890/L891/L892/L893/L894/L895/L896/L897/L898/L899/L900/L901/L902/L903/L904/L905/L906/L907/L908/L909/L910/L911/L912/L913/L914/L915/L916/L917/L918/L919/L920/L921/L922/L923/L924/L925/L926/L927/L928/L929/L930/L931/L932/L933/L934/L935/L936/L937/L938/L939/L940/L941/L942/L943/L944/L945/L946/L947/L948/L949/L950/L951/L952/L953/L954/L955/L956/L957/L958/L959/L960/L961/L962/L963/L964/L965/L966/L967/L968/L969/L970/L971/L972/L973/L974/L975/L976/L977/L978/L979/L980/L981/L982/L983/L984/L985/L986/L987/L988/L989/L990/L991/L992/L993/L994/L995/L996/L997/L998/L999/L1000/L1001/L1002/L1003/L1004/L1005/L1006/L1007/L1008/L1009/L1010/L1011/L1012/L1013/L1014/L1015/L1016/L1017/L1018/L1019/L1020/L1021/L1022/L1023/L1024/L1025/L1026/L1027/L1028/L1029/L1030/L1031/L1032/L1033/L1034/L1035/L1036/L1037/L1038/L1039/L1040/L10

D. TITOLO

Metodo e kit per la valutazione del rischio di patologie cardiovascolari ad eziologia ateromatosa.

L. RIASSUNTO

L'invenzione riguarda un metodo molecolare per valutare in vitro la predisposizione di un individuo allo sviluppo di patologie cardiovascolari, associate alla rottura di una placca aterosclerotica, caratterizzato dal fatto di verificare un polimorfismo sul promotore del gene COX-2 in un campione di DNA genomico di un individuo o di un gruppo di individui.

L'invenzione riguarda inoltre un kit per rivelare tale polimorfismo.

M. DISEGNO



4318 PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"Metodo e kit per la valutazione del rischio di patologie cardiovascolari ad eziologia ateromatosa."

a nome di: CIPOLLONE FRANCESCO

residente in: MONTESILVANO (PE)

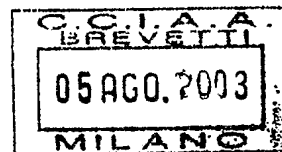
a nome di: MEZZETTI ANDREA

residente in: FRANCAVILLA AL MARE (CH)

a nome di: MARTINOTTI STEFANO

residente in: ROMA

Inventori designati : CIPOLLONE Francesco, MEZZETTI Andrea,
MARTINOTTI Stefano



depositata il

con n.

2003A001601Z

CAMPO DELL'INVENZIONE

Il campo dell'invenzione è quello dei metodi molecolari di diagnosi e prognosi per le malattie cardiovascolari.

TECNICA ANTERIORE

L'infarto del miocardio e l'ictus cerebrale sono causati prevalentemente dalla rottura di placche aterosclerotiche instabili che si formano nelle arterie coronarie e carotidee.

Esse rappresentano la principale causa di morte e disabilità nel mondo occidentale. Nei soli Stati Uniti si calcola ci siano circa 62 milioni di persone affette da patologie cardiovascolari e nel 2000 circa un milione di decessi (il 39% di quelli totali), sono stati attribuiti a queste patologie. Si ha ragione di credere che la spessa incidenza percentuale possa

A handwritten signature in dark ink, consisting of stylized, overlapping loops.

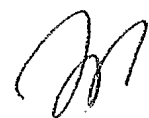
essere considerata anche per il nostro paese. Studi epidemiologici e randomizzati hanno fornito solide evidenze sul fatto che l'infarto e l'ictus possono essere prevenuti mediante il trattamento dei classici fattori di rischio quali diabete, ipertensione, fumo, ipercolesterolemia, obesità. Ciononostante, il controllo di questi fattori, sebbene in grado di ridurre l'incidenza di infarto od ictus, non è risultato in grado di annullare il rischio di tali malattie, suggerendo l'esistenza di una componente ereditaria, ad oggi ancora non ben chiarita, per l'infarto del miocardio e l'ictus cerebrale.

Pertanto è altamente sentita nel settore l'esigenza di saggi predittivi del rischio genetico di sviluppare tali malattie.

Recentemente, Papafili e collaboratori hanno riportato l'identificazione di due varianti nel promotore del gene per la cicloossigenasi-2 (COX-2) umana: la mutazione G \rightarrow C in posizione -765 e la mutazione C \rightarrow G in posizione -490 (Papafili et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22:1631-1636). La presenza della prima variante (citosina o C in posizione -765) è stata associata con una ridotta espressione del gene COX-2 e con livelli serici di proteina C-reattiva () inferiori ai rispettivi livelli in soggetti operati di by-pass coronarico e portatori del nucleotide G nella stessa posizione. Papafili pertanto ipotizza che tale polimorfismo costituisca un indice diagnostico di particolare importanza nella risposta infiammatoria acuta, in particolar modo nella risposta acuta agli interventi di by-pass coronarici.

SOMMARIO

L'invenzione riguarda un metodo per valutare *in vitro* la predisposizione



di un individuo allo sviluppo di patologie cardiovascolari, associate alla rottura di una placca aterosclerotica, caratterizzato dal fatto di verificare l'identità del nucleotide in posizione -765 rispetto al sito di inizio della trascrizione del gene COX-2 su un campione di DNA genomico di tale individuo.

Il metodo è attuato preferibilmente mediante sequenziamento, digestione endonucleasica con enzimi di restrizione, ibridazione selettiva con oligonucleotidi specifici per il polimorfismo in posizione -765 del promotore del gene COX-2 umano, real time PCR. Nel caso in cui il metodo sia basato sulla digestione endonucleasica questa è preceduta da una amplificazione PCR con oligonucleotidi comprendenti le seq IDN3 e 4.

L'invenzione comprende inoltre un kit per attuare il metodo di rivelazione.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1. Visualizzazione del profilo di restrizione dopo digestione enzimatica con l'enzima di restrizione Fau I mediante elettroforesi.

Il frammento amplificato con gli oligonucleotidi seqIDN3 e IDN4 (Cox-F e Cox-R) dalla regione del promotore del gene COX-2, è di 231 pb. Esso contiene la sequenza consensus (CCCGCC) riconosciuta dall'enzima FauI. Questo taglia solo la sequenza wild type, recante il nucleotide G in posizione -765 del promotore. Dopo la digestione enzimatica, la soluzione di DNA viene fatta correre elettroforeticamente su gel di poliacrilammide. Nel caso di sequenza *wild type* (CCCGCC), dal taglio endonucleasico si originano due frammenti, rispettivamente di 124 e

107pb. Nel caso di sequenza mutata (CCCCC), recante il nucleotide C anziché G, si ottiene un frammento unico di 231pb. Per la visualizzazione delle bande il gel viene colorato con una soluzione di bromuro di etidio, quindi sottoposto ad irraggiamento con una sorgente di raggi UV. I campioni A, B e D sono omozigoti per il polimorfismo COX-2 -765G/G; il campione C è omozigote C/C; i campioni E,F sono eterozigoti G/C.

Figura 2: Espressione di COX-2 nelle placche aterosclerotiche

La fotografia evidenzia l'espressione del gene COX-2 in sezioni di placche aterosclerotiche mediante metodo immunoistochimico basato su anticorpi specifici per l'enzima COX-2. I portatori del polimorfismo -765 in forma omozigote (G/G) presentano una colorazione più abbondante rispetto agli altri individui, eterozigoti (G/C) o omozigoti (C/C).

Figura 3: Espressione di metalloproteasi nelle placche aterosclerotiche.

La fotografia evidenzia l'espressione delle metalloproteasi 2 (MMP2) e 9 (MMP9) in sezioni di placche aterosclerotiche mediante metodo immunoistochimico, basato sull'uso di anticorpi anti-metalloproteasi. Tale espressione risulta superiore negli individui omozigoti per il polimorfismo -765 (G/G) rispetto agli eterozigoti (G/C) e agli omozigoti (C/C).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Definizioni

Ai fini della presente invenzione i termini elencati hanno il significato seguente:



Allele: forma alternativa di un gene. Gli alleli di un determinato gene occupano sui cromosomi omologhi la stessa posizione.

BMI (Body Mass Index): indice di massa corporea.

COX-2 (cicloossigenasi 2): prodotto del gene parzialmente corrispondente alla regione genica con sequenza riportata in GenBank con n° di accesso AF276953 e corrispondente alla SEQ. ID N. 1.

Controlli: soggetti ad elevato rischio cardiovascolare ma senza pregresso infarto del miocardio od *ictus cerebri*.

Eterozigote: individuo che porta alleli differenti nello stesso locus dei suoi due cromosomi omologhi.

Genotipizzazione: determinazione degli alleli di un cromosoma di un certo individuo.

Omozigote: individuo che possiede alleli identici nello stesso locus dei suoi due cromosomi omologhi.

Pazienti: soggetti ad elevato rischio cardiovascolare con pregresso infarto del miocardio od *ictus cerebri* (pazienti e controlli oggetto di studio hanno sottoscritto un consenso informato prima di ogni esame).

Placche aterosclerotiche vulnerabili: placche considerate instabili per la presenza di un'elevato infiltrato infiammatorio in grado di provocarne nel tempo la rottura.

Polimorfismo: situazione in cui due o più alleli di un locus, nell'ambito di una popolazione di individui, si presentano diversi per almeno un nucleotide.

Polimorfismo -765 del gene COX-2: si riferisce al polimorfismo in posizione -765 sul promotore del gene COX-2 rispetto al sito d'inizio



della trascrizione, descritto da Papafili et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22:1631-1636 e corrisponde alla possibilità di variazione del nucleotide n°436 di SEQ. ID N.1. Nella presente invenzione è stata definito *wild type* la presenza di una G in posizione -765 compresa nella sequenza (CCCGGCC).

Descrizione

La presente invenzione è basata sulla conferma clinica in un campione di più di mille individui dell'esistenza di una relazione tra la presenza del polimorfismo C-G del promotore COX-2 in posizione -765 (corrispondente alla posizione del nucleotide 436 di SEQ. ID N. 1) ed instabilità della placca aterosclerotica. Tale instabilità ha come conseguenza diretta un maggior rischio di patologie cardiovascolari associate con la rottura o l'erosione di placche aterosclerotiche vulnerabili ed in particolare quindi di infarto del miocardio e di l'ictus cerebrale.

Secondo un primo aspetto quindi l'invenzione riguarda un metodo per diagnosticare *in vitro* la predisposizione di un individuo allo sviluppo di patologie cardiovascolari associate con la rottura o l'erosione di placche aterosclerotiche vulnerabili, in particolare di infarto del miocardio e di ictus, che comprende essenzialmente la verifica dell'identità del nucleotide in posizione -765 (corrispondente al nucleotide 436 di SEQ. ID N.1) rispetto al sito di inizio della trascrizione del gene cicloossigenasi-2 (COX-2) su un campione di DNA genomico proveniente da un campione biologico appartenente a tale individuo. Il campione biologico è preferibilmente costituito da sangue, saliva,



biopsie, urine. Ancor più preferibilmente il campione è costituito da sangue.

Il valore diagnostico e prognostico dell'invenzione è supportato da uno studio su un campione di 1441 individui reclutati in centri italiani, che indica che il gruppo di pazienti che non ha subito un infarto del miocardio o un ictus presenta la variante polimorfica corrispondente al nucleotide C su almeno un allele in posizione -765 del promotore COX-2 con frequenza significativamente superiore rispetto al gruppo di pazienti con pregresso infarto del miocardio o un ictus e bilanciati per età, BMI, o per fattori di rischio convenzionali per le patologie cardiovascolari quali: fumo di sigaretta, obesità, ipertensione, ipercolesterolemia e diabete.

I dati relativi allo studio sono presentati in tabella 2: in particolare è evidenziato che la frequenza degli eterozigoti per il polimorfismo in posizione -765 è almeno 2 volte più alta nei controlli che nei pazienti (43.1% vs 17.9%) e che la frequenza degli omozigoti per il polimorfismo C/C in posizione -765 (cioè presenza di C su entrambi gli alleli) è di almeno cinque volte superiore nei controlli rispetto ai pazienti (6.2% vs 1.1%).

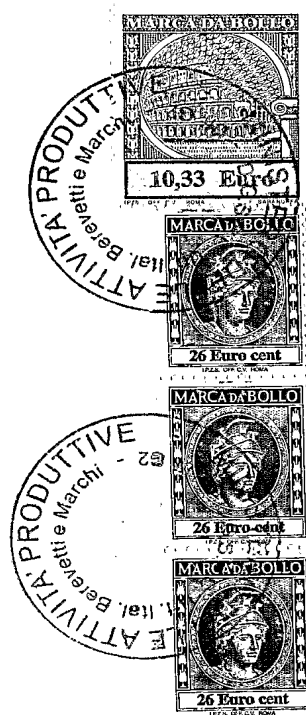
Lo studio clinico ha permesso inoltre di verificare *in situ* la situazione delle placche aterosclerotiche confermando che l'espressione dell'enzima COX-2 è significativamente maggiore nei portatori del polimorfismo -765 G/G (in forma omozigote quindi) e decresce negli eterozigoti e negli omozigoti per il polimorfismo C/C (8576 ± 176 , 5132 ± 142 , 3059 ± 117 , rispettivamente). Tale situazione correla con il profilo di



espressione dell'enzima COX-2 nei macrofagi isolati da placche aterosclerotiche, così come nei monociti isolati da sangue periferico.

Anche l'espressione di metalloproteinasi di matrice (MMP) 2 e 9, verificata *in situ* mediante immunoistochimica, western-blot e zimografia su estratti di placche aterosclerotiche, risulta essere superiore nei portatori del polimorfismo G/G in forma omozigote, rispetto agli eterozigoti G/C ed agli omozigoti C/C. In particolare i valori ottenuti in Western blot per la MMP-2 risultano essere: omozigoti G/G 7165 ± 134 vs G/C 5121 ± 78 e C/C 3978 ± 67 unità arbitrarie densitometriche (DU); per la MMP-9 8090 ± 187 vs 6012 ± 102 e 4765 ± 95 DU; media \pm SD; $P < 0.0001$). Nella zimografia la quantità di enzimi in forma attivata risulta essere per la MMP-2: omozigoti G/G 3012 ± 134 eterozigoti G/C 1898 ± 104 e omozigoti C/C 1342 ± 54 DU; per MMP-9: 3867 ± 165 vs 2011 ± 89 e 1223 ± 65 DU; media \pm SD; $P < 0.0001$). Questi dati sembrano ben correlare con l'ipotesi che l'instabilità delle placche aterosclerotiche sia dovuta direttamente ad un'azione proteolitica esercitata da enzimi quali le metalloproteasi di matrice attivate dall'espressione del gene COX-2 ed espresse in misura superiore, come l'enzima COX-2, nei portatori del polimorfismo -765 G rispetto ai portatori del polimorfismo -765 C.

E' stato già messo in evidenza da altri che il polimorfismo -765G/C è posizionato in una regione molto vicina ad una della sequenze consensus per il fattore trascrizionale SP1 (GGGAGG e varianti GGGCCC e CCCGCC, descritte in Xu Q et al, J Biol Chem 2000;275:24583-24589) e può quindi avere un effetto diretto sui livelli di



espressione di tale gene.

Nel presente studio è stato inoltre confermato che anche i livelli di hsCRP (high sensitivity C-Reactive Protein, descritta in Ridker et al. Circulation, 1998, 97: 425-428) nei portatori del polimorfismo C sono risultati significativamente più bassi rispetto ai soggetti non portatori del polimorfismo (0.78 ± 0.1 vs 2.56 ± 0.4) in un sottogruppo di circa 200 individui.

La verifica dell'identità del nucleotide in posizione -765 a scopo prognostico per la valutazione del rischio o della predisposizione allo sviluppo di patologie quali l'infarto del miocardio e l'ictus cerebrale dovuti a rottura delle placche aterosclerotiche, è effettuata mediante una delle seguenti tecniche: sequenziamento diretto della regione comprendente tale polimorfismo, digestione endonucleasica con enzimi di restrizione, ibridazione selettiva con oligonucleotidi specifici per il polimorfismo in posizione -765 del promotore del gene COX-2 umano. Numerose tecniche, ben note nell'arte, sono utilizzabili per individuare nel DNA genomico la presenza della mutazione secondo il metodo dell'invenzione. Tecniche adatte sono, ad esempio, tecniche basate sull'acquisizione o la perdita di siti di riconoscimento per enzimi di restrizione (Kan et al, Lancet: 910-912, 1978), tecniche di ibridazione con sonde oligonucleotidiche allele-specifiche (ASO) (Wallace ed altri, Nucl Acids Res 6: 3543-3557, 1978) tra cui, ad esempio, ibridazione con oligonucleotidi immobilizzati su filtri (Saiki e altri, PNAS USA 86: 6230-6234, 1989) o micro-chips (Chee e altri, Science 274:610-614, 1996) e oligonucleotide arrays (Maskos e altri, Nucl Acids Res 21: 2269-2270,



1993), PCR allele-specifica (Newton e altri Nucl Acid Res 17:2503-2516, 1989), Mismatch Repair Detection (MRD) (Faham e Cox Genome Res: 474-482, 1995), Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis (Ravnik-Glavac et al, Hum. Mol. Gen. 3: 801, 1994), gel elettroforesi in gradiente denaturante (Guldborg et al., Nucl. Acids Res. 22: 880, 1994), Hot Cleavage (Cotton et al. Proc.Natl. Acad Sci USA 85: 4397, 1988), Genetic Bit Analysis (GBA) (Nikiforov e altri Nucl Acid Res 22:4167-4175, 1994), primer-ligation assay (OLA) (Landergeren e altri, Science 241: 1077, 1988), allele specific ligation chain reaction (LCR) (Barrany PNAS USA 88:189-193, 1991), gap-LCR (Abravaya e altri Nucl Acids Res 23: 675-682, 1995), tecniche di real-time PCR (Chen YY, Int J Oncol. 2003 Sep;23(3):737-44) e tecniche di sequenziamento. Tecniche particolarmente preferite per l'individuazione del polimorfismo -765 secondo il metodo dell'invenzione sono scelte tra quelle basate sull'acquisizione o la perdita di siti di riconoscimento per enzimi di restrizione, sulla PCR allele specifica, sulle tecniche di ibridazione, su real-time PCR o su tecniche di sequenziamento diretto dopo amplificazione di frammenti di DNA della regione del promotore del gene per la COX-2 comprendenti la posizione -765.

Il metodo ed il kit dell'invenzione consentono di valutare in un individuo o in un gruppo d'individui apparentemente sani il rischio di sviluppare patologie cardiovascolari dovute alla rottura delle placche aterosclerotiche. Secondo una realizzazione preferita il metodo comprende i seguenti passaggi:

a) estrazione del DNA genomico da un campione biologico di tale/i



individuo/i,

- b) amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction con oligonucleotidi o primers adatti all'amplificazione di un frammento di DNA comprendente la posizione -765,
- c) digestione enzimatica di tale frammento amplificato con enzimi di restrizione in grado di discriminare tra le sequenze recanti il polimorfismo -765 C (compreso nella sequenza esanucleotidica CCCCCC ed il polimorfismo -765 G, compreso nella sequenza esanucleotidica CCCGCCC,
- d) separazione elettroforetica della miscela di restrizione comprendente i frammenti di restrizione generati oppure il frammento amplificato in forma indigerita, oppure entrambi, ed analisi della lunghezza di tali frammenti, dove in particolare l'acquisizione del sito di restrizione per gli enzimi di restrizione Aci I o Fau I (CCGC//GGCG o CCCGC(N)4//GGGCG(N)6, rispettivamente) è indice della presenza di una guanina (G) in posizione -765 che correla con un fattore di rischio superiore nello sviluppo di malattie cardiovascolari, in particolare infarto del miocardio ed ictus, mentre la perdita di tale sito di restrizione correla con un indice di rischio inferiore.

Nella digestione endonucleasica con enzimi di restrizione specifici per la sequenza di 4-12 basi comprendente il nucleotide polimorfo, l'enzima Fau I è preferito rispetto all'enzima Aci I in quanto più stabile e specifico. Secondo una realizzazione preferita, l'amplificazione b) è effettuata con primers oligonucleotidici che amplificano un frammento dal DNA genomico direttamente o dopo estrazione dal campione biologico,



preferibilmente di lunghezza inferiore a 1000 nucleotidi, preferibilmente inferiore a 500 nucleotidi, ancor più preferibilmente inferiore a 300 nucleotidi, tale frammento comprendente il polimorfismo in posizione – 765.


Oligonucleotidi adatti all'amplificazione di un frammento di dimensioni opportune possono essere disegnati secondo metodi noti nell'arte, essendo nota la sequenza della regione del promotore del gene COX-2 (GenBank, numero di accesso: AF276953), ma devono essere opportunamente validati per la specificità di amplificazione in diverse matrici biologiche. Tali primers sono preferibilmente oligonucleotidi almeno parzialmente identici, cioè comprendenti una sequenza di almeno 10 nucleotidi consecutivi identica agli oligonucleotidi di sequenza ID N.3 e ID N.4. Ancor più preferibilmente gli oligonucleotidi per l'amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) del frammento comprendente il polimorfismo –765 sono gli oligonucleotidi SEQ. ID N. 3 e SEQ. ID N 4. Il frammento generato dall'amplificazione con tali oligo, di 231 nucleotidi, è preferibilmente digerito con l'enzima di restrizione Fau I ed è successivamente preferibilmente analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio o di poliacrilammide.

Secondo il metodo ed i kit prognostici e/o diagnostici dell'invenzione, la presenza di una citosina in posizione –765 del promotore del gene COX-2 e quindi l'assenza della sequenza di riconoscimento per gli enzimi di restrizione specifici sopra indicati su almeno un allele del DNA di un individuo o di un gruppo di individui, correla con un indice di rischio alla



predisposizione di malattie cardiovascolari inferiore a quello associato alla presenza di una guanosina (G) in forma omozigote in posizione -765 su entrambi gli alleli. La presenza di guanosina (G) in posizione -765, e quindi la presenza della sequenza di riconoscimento per gli enzimi di restrizione specifici sopra indicati, correla con una situazione di rischio maggiore allo sviluppo di patologie cardiovascolari, in particolare di patologie quali le coronaropatie e le patologie delle arterie carotidee, l'infarto del miocardio, l'angina pectoris, le sindromi coronariche acute, l'ictus cerebrale, l'attacco ischemico transitorio (TIA) e l'arteriopatia periferica, e tutte le sindromi trombofiliche in generale. Pertanto la determinazione della presenza di tale nucleotide in posizione -765 altrimenti evidenziabile secondo il metodo dell'invenzione mediante analisi della presenza dei frammenti generati mediante taglio endonucleasico, insieme con la valutazione di altri parametri di competenza del medico, fornisce una indicazione intermedia della opportunità di instaurare una adeguata terapia preventiva di tali disturbi.

Il dato di genotipizzazione, ossia della caratterizzazione del nucleotide in posizione -765 del promotore del gene per la COX-2 è inoltre associato sia con una minore espressione basale dell'enzima cicloossigenasi-2 che con una minore espressione dopo stimolazione, consentendo di valutare anche la sensibilità al trattamento con farmaci antiflogistici non steroidei (FANS), in particolare con inibitori specifici della cicloossigenasi-2, anch'essi concorrenti nel determinare una diminuzione dei livelli di attività della cicloossigenasi in particolare nei linfociti e nei macrofagi.



Secondo un ulteriore aspetto l'invenzione riguarda un kit per attuare la genotipizzazione della posizione -765 del promotore della cicloossigenasi-2 (COX-2) secondo la realizzazione preferita del metodo (acquisizione o perdita di un sito di restrizione), per valutare la sensibilità al trattamento con farmaci antiflogistici non steroidei (FANS), in particolare con inibitori specifici della cicloossigenasi-2.

Inoltre l'invenzione in un suo aspetto preferito riguarda un kit prognostico per valutare in un individuo, anche apparentemente sano, il fattore di rischio associato allo sviluppo di malattie cardiovascolari causate da rottura delle placche aterosclerotiche instabili, quali ad es. le coronaropatie causa di infarto del miocardio, l'angina pectoris, le sindromi coronariche acute, l'ictus cerebrale, l'attacco ischemico transitorio (TIA) e l'arteriopatia periferica basato sul metodo secondo la sua realizzazione preferita (acquisizione o perdita di un sito di restrizione).

In ogni caso quando il metodo o il kit per la genotipizzazione del nucleotide -765 del promotore della COX-2, sono basati sull'amplificazione PCR con gli oligonucleotidi dell'invenzione e digestione successiva con endonucleasi di restrizione, nel caso di sequenza wild (CCCGCC, dove la G è in posizione -765) type, il taglio endonucleasico con l'enzima *FauI* o *Acil*, dà origine a due frammenti, di circa 120 e di circa 110 pb e la presenza di almeno una copia allelica di questi due frammenti correla con un indice di rischio superiore per lo sviluppo di patologie cardiovascolari o con una maggiore sensibilità alla terapia con FANS, particolarmente quelli della classe Coxib (COX-2



inibitori). Nel caso di sequenza mutata (CCCCCCC), recante il nucleotide C anziché G, dove la digestione non avviene e viene mantenuto il frammento unico di 231pb, la presenza di almeno una copia allelica del frammento di tali dimensioni correla con un indice di rischio inferiore per lo sviluppo di patologie cardiovascolari o con una minore sensibilità alla terapia con FANS, particolarmente quelli della classe Coxib (COX-2 inibitori).

Preferibilmente tale kit è in forma di scatola o di contenitore comprendente un tubo contenente un oligonucleotide comprendente almeno parzialmente la SEQ ID N.3 cioè avente sequenza di almeno 10 nucleotidi consecutivi identica agli oligonucleotidi di sequenza ID N.3 e ID N.4 o ancor più preferibilmente è l'oligonucleotide identificato con la seqIDN 3, un tubo contenente un oligonucleotide comprendente almeno parzialmente la SEQ ID N.4 cioè avente sequenza di almeno 10 nucleotidi consecutivi identica agli oligonucleotidi di sequenza SEQ ID N.4 o ancor più preferibilmente è l'oligonucleotide identificato con la SEQ ID N.4, ed opzionalmente un enzima di restrizione in grado di discriminare il polimorfismo -765 C, compreso nella sequenza esanucleotidica CCCCCC, dal polimorfismo -765 G, compreso nella sequenza esanucleotidica CCCGCC. Tale enzima è preferibilmente scelto tra: l'enzima Fau I e Aci I, anche se l'enzima Fau I è preferito rispetto all'enzima Aci I in quanto più specifico e più stabile, riconoscendo per il taglio endonucleasico la sequenza nucleotidica CCCGC(N)₄[↓]//GGGCG(N)₆[↓] (FauI), anziché la sequenza teatranucleotidica C[↓]CGC//GGC[↓]G (AciI). Opzionalmente il kit

comprende uno standard di peso molecolare per il DNA e/o un tubo contenente concentrazione adeguata di ioni magnesio in soluzione tamponata e/o deoxynucleotidi trifosfato.

Un ulteriore aspetto dell'invenzione è relativo all'uso della genotipizzazione del nucleotide in posizione -765 del promotore del gene COX-2 per la preparazione di saggi prognostici di patologie cardiovascolari scelte tra: coronaropatie, patologie delle arterie carotidee, infarto del miocardio, angina pectoris, sindromi coronariche acute, rivascolarizzazione miocardica mediante by-pass od angioplastica coronarica, ictus cerebrale, attacco ischemico transitorio (TIA), arteriopatia periferica, sindromi trombofiliche, basato essenzialmente sul metodo descritto.

Un ulteriore aspetto è inoltre costituito dall'uso della genotipizzazione del nucleotide in posizione -765 del promotore del gene COX-2 per la preparazione di saggi diagnostici della sensibilità alla terapia con farmaci antiflogistici non steroidei (FANS), basato essenzialmente sul metodo descritto.

PARTE SPERIMENTALE

Esempio 1. Estrazione del DNA da sangue periferico per la genotipizzazione.

Circa 5 ml di sangue periferico sono prelevati da soggetti che costituiscono il campione di studio e raccolti in provette da emocromo contenenti EDTA/citrato e prive di soluzione eparinata. Parte del contenuto, circa 0.5 ml, è poi trasferito in provette "DNase free" e miscelato con un volume di soluzione lisante (soluzione di lisi secondo il



Handwritten signature or initials.

protocollo di estrazione della Ditta Diatech, Jesi-Ancona, Italy); poi viene agitato mediante vortex per alcuni secondi e centrifugato a temperatura ambiente. Il sopranatante è quindi eliminato ed il pellet risospeso con 1 ml di soluzione lisante al fine di procedere tramite ulteriore centrifugazione alla purificazione del pellet di DNA rispetto al contenuto emolizzato presente nella soluzione.

Il pellet così purificato è poi ridisciolti in soluzione tampone contenente Proteinasi K e una bassa concentrazione (0.1%) di sodium lauryl_solfato (SLS) per solubilizzare ulteriormente il DNA e privarlo delle contaminanti proteiche e lipidiche. Dopo ulteriore purificazione il pellet di DNA è sciolto in circa 50 μ l di acqua tamponata contenente 10 mM Tris pH 7.6 e 0.1 mM EDTA.

Si allestisce una reazione di PCR secondo il protocollo standard fornito dal produttore. Lo schema di protocollo è il seguente:

100 ng DNA templatò (DNA genomico o cDNA del campione)

100 μ M finale dNTP

10 pmoli di COX-F e COX-R (corrispondenti alle seq IDN3 e 4)

1X Taq buffer (Perkin-Elmer Taq buffer composition senza Mg)

1.5 mM Mg^{++} (concentrazione finale)

2.5 Units di Taq polimerasi

N° cicli	temperatura	tempo
1	95°C	5'
30	95°C	30"
	60°C	30"
	72°C	30"
1	72°C	7'



La reazione di amplificazione qualitativa viene effettuata con i seguenti oligonucleotidi che amplificano la regione compresa tra -860 e -620 rispetto al sito di inizio della trascrizione del gene COX-2 e comprendente il polimorfismo -765:

Cox-F: 5' CCGCTTCCTTTGTCCATCAG 3' (SEQ. ID N. 3)

Cox-R: 5' GCTATGTACACTGAAGGTAGC 3' (SEQ. ID N. 4)

La sequenza del gene COX-2 è presente in GenBank con il numero di accesso AF276953.

Il segmento amplificato è di 231 basi. Esso viene quindi digerito mediante restrizione enzimatica per almeno tre ore con l'enzima FAU I che riconosce la regione consensus CCCGCC e taglia solo la sequenza wild type recante il nucleotide G in posizione -765 in due frammenti di 124 e 107 bp rispettivamente, e non quella mutata, che reca cioè il nucleotide C in posizione -765, permettendo la genotipizzazione relativa al polimorfismo di tale posizione.

I frammenti generati con la digestione vengono separati mediante elettroforesi su gel di agarosio o di acrilamide e riconoscimento mediante RFLP.

Per la visualizzazione delle bande il gel viene colorato con una soluzione di bromuro di etidio (0.5µm/ml) e decolorato con una soluzione salina, quindi sottoposto ad irraggiamento con una sorgente di raggi UV e fotografato con sistemi di rivelazione standard. Un esempio del pattern di restrizione ottenuto dopo digestione con Fau I in soggetti recanti i vari polimorfismi è visibile in figura 1.

Esempio 2. Caratterizzazione del campione.

Le caratteristiche cliniche del campione costituito da 1441 individui sono riassunte in Tabella 1.

Tabella 1. CARATTERISTICHE DEGLI INDIVIDUI OGGETTO DI STUDIO.

Variabile	PAZIENTI (n=864)	CONTROLLI (n=555)
• Età (anni)	62.7±10	63±9
• Maschi/Femmine (%)	67/33	65/35
• Individui con:		
□ Ipercolesterolemia, n (%)	449 (52)	283 (51)
□ Ipertensione, n (%)	380 (44)	255 (46)
□ Diabete, n (%)	156 (18)	105 (19)
□ Fumo di Sigaretta, n (%)	311 (36)	194 (35)
□ Indice di Massa Corporea (BMI)	27±6	27±7
• NSAID o trattamento con glucocorticoidi	0	0
• CAD provata angiograficamente (n=750)(%)	76.2	76.8
□ Patologia a singolo vaso (%):	30.2	29
□ Patologia a doppio vaso (%):	23.3	23.9
□ Patologia a triplo vaso (%):	22.7	22.1
• Severità della Stenosi ICA (n=232)		
□ Media ± Dev. St. (%)	74±5	74±6
□ Intervallo (%)	70-92	70-91

NSAID = farmaci antiinfiammatori non-steroidi. CAD= coronaropatia. ICA = arteria carotidea interna.

Il campione non presenta incidenze significativamente diverse per i fattori di rischio convenzionali per le patologie cardiovascolari tra cui: essere fumatori abituali, obesità, ipertensione diabete ed

ipercolesterolemia.

I pazienti hanno avuto infarto o ischemia del miocardio o cerebrale collegati unicamente con la rottura delle placche aterosclerotiche. Pazienti con fibrillazione atriale o disfunzione valvolare sono stati invece esclusi dallo studio.

I controlli sono stati reclutati tra individui ospedalizzati per patologie diverse da quelle cardiovascolari in particolare diverse da: infarto del miocardio, angina instabile, TIA o ictus.

Un consenso informato è stato ottenuto da tutti gli individui del campione prima di ogni esame e lo studio è stato approvato dal comitato etico locali.

Esempio 3. Genotipizzazione del campione.

La presenza del polimorfismo G-C nel campione viene verificata secondo il metodo dell'invenzione, come descritto nell'esempio 1.

In tabella 2 sono riassunti i dati della genotipizzazione del campione.



[Handwritten signature]

Tabella 2. DISTRIBUZIONE E ANALISI DI REGRESSIONE LOGISTICA MULTIVARIATA DI VARIANTI COX-2 EFFETTUATA FRA CONTROLLI E PAZIENTI CON INFARTO MIOCARDICO O ICTUS.

GENOTIPO	DISTRIBUZIONE		RAPPORTO	SIGNIFICATIVITA'	ODDS RATIO *	95% CI**
	CONTROLLI	CASI	CONTROLLI/CASI			
<i>Soggetti totali (n=1441)</i>						
GG	50.7%	81%	0.62	P<0.0001		
GC	43.1%	17.9%	2.4	P<0.0001	0.45	0.36-0.68
CC	6.2%	1.1%	5.63	P<0.05	0.34	0.24-0.54
<i>Soggetti con più di 70 anni (n=257; 112 controlli e 145 casi)</i>						
GG	51.3%	89.2%	0.57	P<0.0001		
GC	41.2%	9.7%	4.2	P<0.0001	0.41	0.33-0.78
CC	7.5%	1.1%	6.8	P<0.01	0.31	0.21-0.63
<i>Soggetti con un parente di 1° grado con precedente IMA *** o ictus (n=187; 84 controlli e 103 casi)</i>						
GG	47.9%	88.9%	0.54	P<0.0001		
GC	44.3%	10.3%	4.3	P<0.0001	0.39	0.29-0.64
CC	7.8%	0.8%	9.75	P<0.005	0.28	0.22-0.52

*I rapporti di probabilità riguardano il rischio cumulativo d'infarto miocardico e ictus fra soggetti eterozigoti o omozigoti per il polimorfismo -765 G>C confrontati con quelli che sono omozigoti per il polimorfismo -765 G>G.

**CI = intervallo di confidenza.

***IMA = infarto miocardico acuto.

Come emerge dalla tabella 2, la presenza della mutazione -765 G C risulta essere circa 2.4 volte più alta nei controlli che nei pazienti (43.1% vs 17.9%, $p < 0.0001$) e l'omozigosità C/C circa 5.63 volte più alta nei controlli che nei pazienti (6.2% vs 1.1%, $p < 0.0001$).

Nel sottogruppo di 187 pazienti con un parente di primo grado che aveva subito infarto del miocardio o ictus la presenza di una C in posizione -765 è del 10.3%, 4.3 volte più bassa che nei controlli.

All'interno dei sottogruppi clinici di pazienti che avevano subito infarto del miocardio o ictus non viene rilevata alcuna differenza nella frequenza dell'allele recante il polimorfismo C (17.5 vs 17.7).

Esempio 4. Caratterizzazione delle placche aterosclerotiche.

L'espressione di COX-2 è valutata nelle placche aterosclerotiche di 232 pazienti sottoposti durante lo studio ad endoarterectomia. Le sezioni e la colorazione immunoistochimica delle placche aterosclerotiche è effettuata come descritto in Cipollone et al, Circulation 2001. La colorazione specifica per l'enzima COX-2 risulta più abbondante nella placche carotidee di portatori del polimorfismo -765 G (vedi figura 2).

Le sezioni di placca vengono poste su vetrini pretrattati con polyisina, fissate con acetone freddo per 10 minuti e lavate 2 volte con il tampone PBS. L'attività perossidasi endogena viene bloccata incubando i vetrini per 5 minuti con una soluzione al 3% di H_2O_2 . Dopo due lavaggi di 15 minuti ciascuno con PBS, i vetrini vengono saturati per 30 minuti con la "blocking solution" (PBS contenente l'1% di BSA) e successivamente vengono incubati per 60 minuti con gli anticorpi primari diluiti nella blocking solution. Si tratta di anticorpi monoclonali specifici per la COX-



2, di anticorpi monoclonali specifici per la MMP-2 e anticorpi monoclonali specifici per la MMP-9 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), rispettivamente per l'enzima COX-2 e per le metalloproteasi. Successivamente, i vetrini vengono lavati con PBS per 2 volte e incubati per 30 minuti con l'anticorpo secondario coniugato con la biotina (DAKO LSAB2 System, Peroxidase, Dako Corporation, Carpinteria, CA). Dopo altri 2 lavaggi in PBS, i tessuti vengono trattati per 30 minuti con 100 µl di una soluzione contenente Streptavidina coniugata con l'enzima perossidasi. Dopo 2 lavaggi in PBS, i vetrini vengono incubati con il substrato cromogeno diaminobenzidina (DAB) allo 0.05% per 10 minuti e nuovamente lavati con PBS.

La presenza di COX-2 è particolarmente alta nei macrofagi ed il dato viene confermato anche mediante western-blot.

La colorazione specifica per le metalloproteinasi 2 e 9 (MMP2 e MMP9) viene valutata sia mediante immunoistochimica (vedi figura 3) che western-blot. Come si può evincere dalle figure relative all'immunoistochimica, anche l'espressione di questi due enzimi risulta superiore nelle placche dei portatori del polimorfismo G. La zimografia effettuata su estratti preparati dalle stesse dimostra inoltre che i due enzimi sono in forma attivata.

Esempio 5. Valutazione dell'attività dei monociti/macrofagi in vitro.

I monociti isolati dai pazienti sono trattati in vitro con LPS, oxLDL, angiotensina II e AGE (*prodotti di glicosilazione avanzata*). Come evidenziato in figura 3, tutti gli stimoli determinano un aumento della sintesi di COX-2, MMP-2 e MMP-9 nei monociti di pazienti portatori



dell'allele -765 G/G rispetto a quelli portatori del polimorfismo C sia in forma omozigote che in forma eterozigote.

I macrofagi infiltrati nelle placche sono isolati come descritto in de Vries et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999, 19:638-645. Nei macrofagi sono osservati risultati analoghi ai precedenti.



RIVENDICAZIONI

1. Metodo per valutare *in vitro* la predisposizione di un individuo allo sviluppo di patologie cardiovascolari caratterizzato dal fatto di verificare l'identità del nucleotide in posizione -765 rispetto al sito di inizio della trascrizione del gene COX-2 su un campione di DNA genomico di tale individuo.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1 dove il DNA genomico viene estratto da cellule di tale individuo provenienti da campioni di sangue, saliva, biopsie, urine, tessuto umano.
3. Metodo secondo la rivendicazione 2 dove tali patologie cardiovascolari sono causate o associate a rottura di una placca aterosclerotica.
4. Metodo secondo la rivendicazione 1-3 dove tali patologie cardiovascolari sono coronaropatie, patologie delle arterie carotidee, infarto del miocardio, angina pectoris, sindromi coronariche acute, rivascolarizzazione miocardica mediante by-pass od angioplastica coronarica, ictus cerebrale, attacco ischemico transitorio (TIA), arteriopatia periferica, sindromi trombofiliche.
5. Metodo secondo la rivendicazione 4 dove tale verifica è effettuata mediante una delle seguenti tecniche: sequenziamento, digestione endonucleasica con enzimi di restrizione, ibridazione selettiva con oligonucleotidi specifici per il polimorfismo in posizione -765 del promotore del gene COX-2 umano, metodologia di single strand conformation polymorfism (SSCP), DGGE, Fluorescence assisted mismatch analysis (FAMA), heteroduplex analysis, real time PCR.

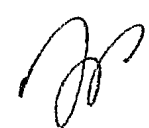


6. Metodo secondo la rivendicazione 5 dove tale verifica è effettuata mediante digestione endonucleasica con enzimi di restrizione.
7. Metodo secondo la rivendicazione 6 comprendente i seguenti passaggi:
 - estrazione del DNA genomico da un campione biologico di un individuo,
 - amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction con oligonucleotidi o primers adatti all'amplificazione di un frammento di DNA comprendente la posizione -765,
 - digestione enzimatica di tale frammento amplificato con enzimi di restrizione scelti tra: Fau I e Aci I
 - separazione elettroforetica della miscela di restrizione comprendente i frammenti di restrizione generati oppure il frammento amplificato in forma indigerita, oppure entrambi,
 - analisi del profilo di restrizione generato dopo visualizzazione del DNA.
8. Metodo secondo la rivendicazione 7 caratterizzato dal fatto che l'amplificazione è effettuata con oligonucleotidi aventi sequenze almeno parzialmente identiche alle sequenze ID N.3 e ID N.4 ed il frammento amplificato viene digerito con l'enzima di restrizione Fau I.
9. Metodo secondo la rivendicazione 8 caratterizzato dal fatto che l'amplificazione è effettuata con oligonucleotidi aventi sequenze identiche alle SEQ. ID N.3 e 4.
10. Metodo secondo le rivendicazioni 1-9 caratterizzato dal fatto che la presenza di una citosina (C) in posizione -765 del promotore del



gene COX-2 su almeno un allele del DNA di tale individuo è un indice di rischio alla predisposizione di malattie cardiovascolari inferiore a quello associato alla presenza di una guanosina in posizione -765 su entrambi gli alleli.

11. Kit per attuare il metodo secondo le rivendicazioni 1-10.
12. Kit secondo la rivendicazione 11 caratterizzato dal fatto di comprendere almeno uno tra i seguenti reagenti: oligonucleotide comprendente almeno 10 nucleotidi consecutivi della seq ID N.3 ed oligonucleotide comprendente almeno 10 nucleotidi consecutivi della seq ID N.4, almeno un enzima di restrizione scelto tra: Fau I e Aci I.
13. Kit secondo la rivendicazione 12 comprendente almeno uno dei seguenti reagenti: oligonucleotide di sequenza ID N.3 ed oligonucleotide di sequenza ID N.4, enzima di restrizione Fau I ed opzionalmente uno standard di peso molecolare .
14. Uso della genotipizzazione del nucleotide in posizione -765 del promotore del gene COX-2 per la preparazione di saggi prognostici di patologie cardiovascolari scelte tra: coronaropatie, patologie delle arterie carotidee, infarto del miocardio, angina pectoris, sindromi coronariche acute, rivascolarizzazione miocardica mediante by-pass od angioplastica coronarica, ictus cerebrale, attacco ischemico transitorio (TIA), arteriopatia periferica, sindromi trombofiliche.
15. Uso della genotipizzazione del nucleotide in posizione -765 del promotore del gene COX-2 per la preparazione di saggi diagnostici della sensibilità alla terapia con farmaci antiflogistici non steroidei (FANS).



4318 PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

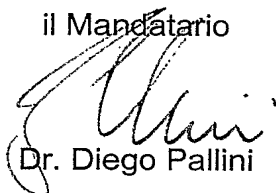
(SM/pd)

Milano, lì 5 Agosto 2003

p. CIPOLLONE FRANCESCO, MEZZETTI ANDREA, MARTINOTTI

STEFANO

il Mandatario


Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

SM



Listato sequenze

<120> Metodo e kit per la valutazione del rischio di patologie cardiovascolari ad eziologia ateromatosa

<130> 4318PTIT

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1400

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<221> CDS

<222> (1335)..(1400)

<223> Gene per la ciclooossigenasi-2 (PTGS2) umana.

Numero di accesso Gen Bank: AF276953.

Il Nucleotide in posizione 1371 è "n".

La sequenza consensus per Fau I è "cccgcc" e corrisponde ai nucleotidi 433-438.

<400> 1

ttccagctgt caaaatctcc cttccatcta attaattcct catccaacta tgttccaaaa	60
cgagaataga aaattagccc caataagccc aggcaactga aaagtaaagtg ctatgttgta	120
ctttgatcca tggtcacaac tcataatctt ggaaaagtgg acagaaaaga caaaagagtg	180
aactttaaaa ctcgaattta ttttaccagt atctcctatg aagggttagt aaccaaata	240
atccacgcat caggagaga aatgccttaa ggcatacgtt ttggacattt agcgccctg	300
caaattctgg ccacgcccgc ttcctttgtc catcagaagg caggaaactt tatattggtg	360
accggtggag ctcacattaa ctatttacag ggtaactgct taggaccagt attatgagga	420
gaatttacct ttccgcctc tctttccaag aaacaaggag ggggtgaagg tacggagaac	480
agtatttctt ctggtgaaag caacttagct acaaagataa attacagcta tgtacactga	540
aggtagctat ttcattccac aaaataagag ttttttaaaa agctatgtat gtatgtgctg	600
catatagagc agatatacag cctattaagc gtcgtcacta aaacataaaa catgtcagcc	660
tttcttaacc ttactcgccc cagtctgtcc cgacgtgact tctcgaccc tctaaagacg	720
tacagaccag acacggcggc ggcggcggga gaggggattc cctgcgcccc cggacctcag	780

```

ggccgctcag attcctggag aggaagccaa gtgtccttct gccctcccc ggtatcccat      840
ccaaggcgat cagtccagaa ctggctctcg gaagcgctcg ggcaaagact gcgaagaaga      900
aaagacatct ggcggaaacc tgtgcgctcg gggcggtgga actcggggag gagagggagg      960
gatcagacag gagagtgggg actaccccct ctgctcccaa attggggcag cttcctgggt      1020
ttccgatttt ctcat ttcg tgggtaaaaa accctgcccc caccgggctt acgcaatttt      1080
tttaagggga gaggagggaa aaatttgtgg ggggtacgaa aaggcggaaa gaaacagtca      1140
tttcgtcaca tgggcttggt tttcagtctt ataaaaagga aggttctctc ggtagcgac      1200
caattgtcat acgacttgca gtgagcgtca ggagcacgtc caggaactcc tcagcagcgc      1260
ctccttcagc tccacagcca gacgccctca gacagcaaag cctacccccg cgccgcgccc      1320
tgcccgccgc tgcg atg ctc gcc cgc gcc ctg ctg ctg tgc gcg gtc ctg      1370
      Met Leu Ala Arg Ala Leu Leu Leu Cys Ala Val Leu
      1          5          10

acg ctc agc cat aca ggt gag tac ctg gcg      1400
Thr Leu Ser His Thr Gly Glu Tyr Leu Ala
      15          20

```

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Leu Ala Arg Ala Leu Leu Leu Cys Ala Val Leu Thr Leu Ser His
1          5          10          15

```

```

Thr Gly Glu Tyr Leu Ala
      20

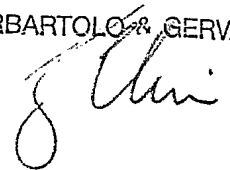
```

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens



<221> misc_feature

<223> Forward primer
Corrisponde ai nucleotidi 317-336 di SEQ. ID N.1.

<400> 3
ccgcttcctt tgtccatcag

20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

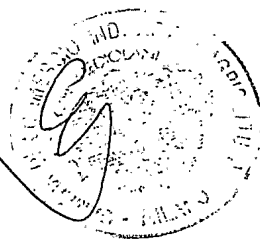
<213> Homo sapiens

<221> misc_feature

<223> Reverse primer
Corrisponde ai nucleotidi 527-547 di SEQ. ID N.1

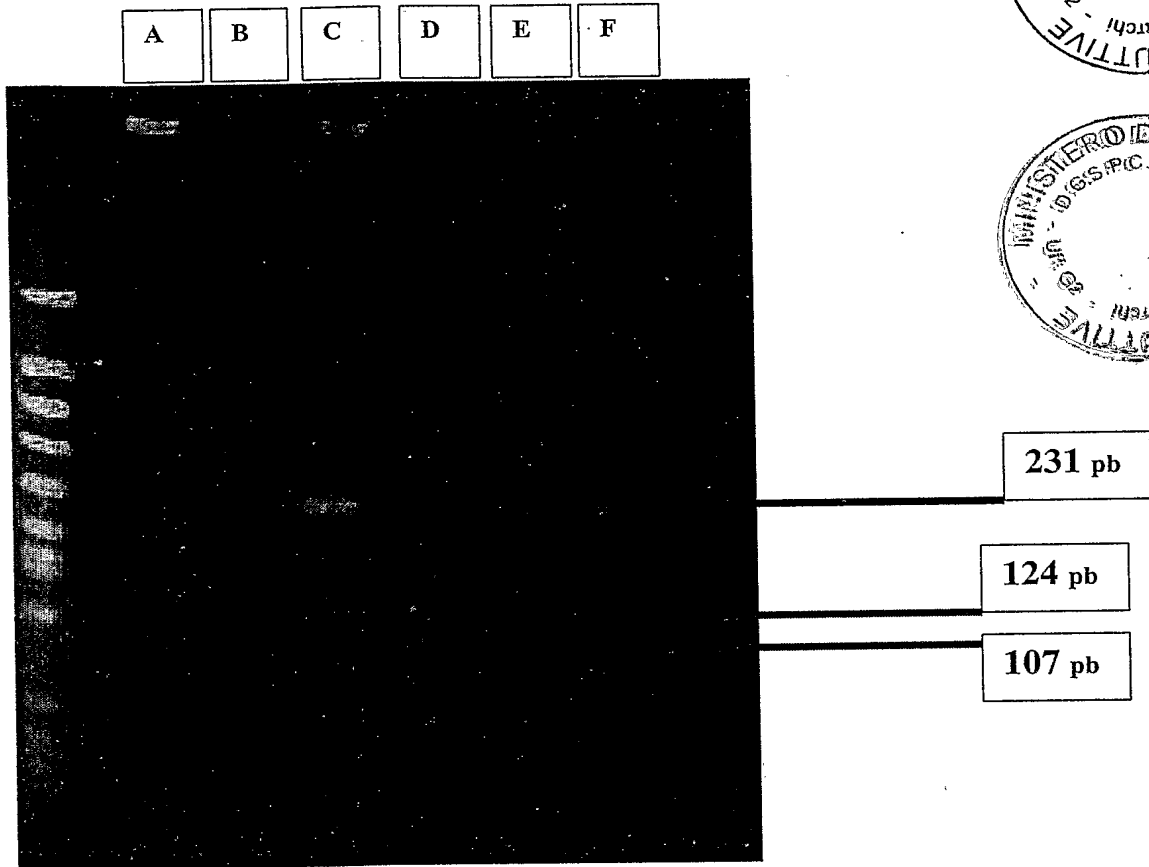
<400> 4
gctatgtaca ctgaaggtag c

21



[Handwritten signature]

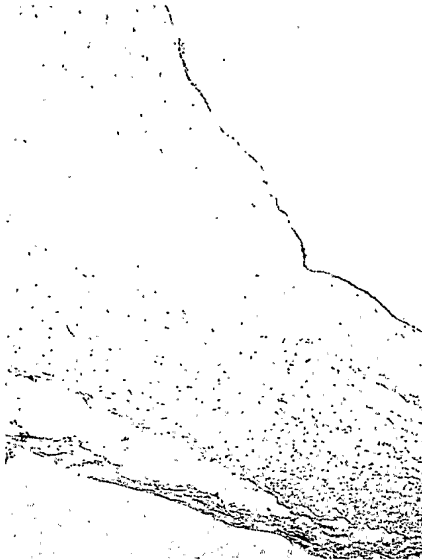
Figura 1.



2003A001607

[Handwritten signature]

CC



GC

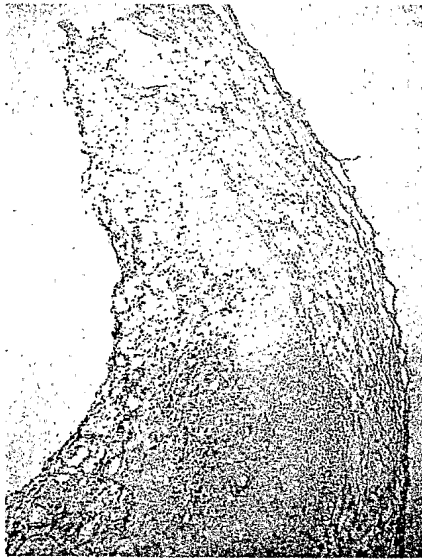


FIG. 2

M 2003A001607

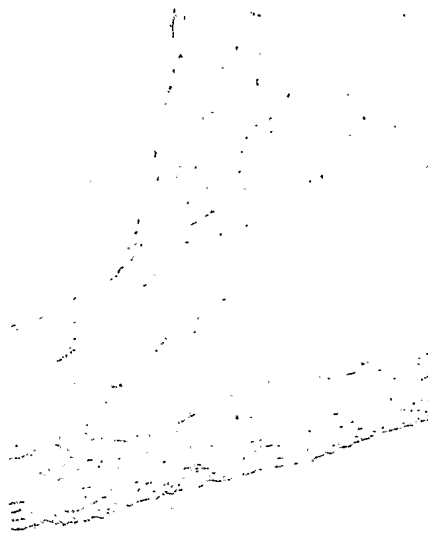


GG



J. Thini

CC



GC



FIG. 3

2003A001607



GG

